基于质谱和生物信息学分析的小菜蛾蛋白质鉴定

谢　苗[1,2]，成　娟[1]，尤民生[1,*]，杨　广[1]，蔡敬轩[2]
（1. 福建农林大学应用生态研究所，福州 350002；2. 福建农林大学生命科学学院，福州 350002）

摘要：本研究以非模式昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 为材料，对比 2，3，4 龄幼虫的蛋白质组双向电泳图谱，得到 24 个蛋白质差异点，从中选取了编号为 1111 的差异表达蛋白质点进行质谱鉴定和生物信息学分析。采用胶内酶解的多肽进行 MALDI-TOF/TOF 分析，获得该点的肽质量指纹图谱(PMF)及串联质谱(MS/MS)图谱。将获得的 PMF 分别用 MASCOT 和 ProFound 等常用软件在 NCBInr 的 Metazoa 蛋白质数据库进行搜索，匹配结果不理想。进一步用 PMF + MS/MS 谱图搜索 NCBInr 的 Metazoa 蛋白质数据库，以及小菜蛾 EST 数据库。在 NCBInr 库中匹配结果为拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura* 中的一种假定蛋白 GA18218-PA，而用 EST 库搜索的结果为家蚕 *Bombyx mori* 的 ATP 合酶的亚基。为验证搜索结果，将该蛋白质点进行磺基异硫氰酸苯酯(SPITC)化学衍生后 *de novo* 测序，最后确认该点可能为 ATP 合酶的一个亚基。最后着重讨论了蛋白质的质谱鉴定与生物信息学分析的联合使用，希望据此选择出最适合于非模式昆虫蛋白质组学鉴定的方法。

关键词：小菜蛾；蛋白质；肽质量指纹图谱；串联质谱；*de novo* 测序；生物信息学
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)11-1206-07

Protein identification for the diamondback moth, *Plutella xylostella*, based on mass spectrometry and bioinformatics analysis

XIE Miao[1,2], CHENG Juan[1], YOU Min-Sheng[1,*], YANG Guang[1], CAI Jing-Xuan[2] (1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Protein expression in different larval instars of the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella*, was characterized by two dimensional gel electrophoresis (2-DE). Twenty-four differentially expressed protein spots were discriminated. The spot 1111 was selected for peptide mass fingerprinting (PMF) and peptide sequence using matrix-assisted laser desorption ionization of time-of-flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS). The PMF was used to search for the matched protein based on NCBInr Metazoa database with MASCOT and ProFound softwares, but the match was unsatisfied. The PMF + MS/MS spectrum was further used to search for the matched protein, and the protein was identified as GA18218-PA of *Drosophila pseudoobscura* based on the NCBInr Metazoa database while it was identified as the subunit d of H^+ transporting ATP synthase of *Bombyx mori* based on the EST database of DBM population. To validate the result of matching, the spot was used for chemical N-terminal derivatization of the tryptic peptides with 4-sulfophenyl isothiocyanate (SPITC) prior to MALDI-TOF/TOF MS, and the protein was identified as a subunit of ATP synthase again. Finally, potential application of MS analysis and bioinformatics as tools to select the optimal method in proteomic research on non-model insects was discussed in some detail.

Key words: *Plutella xylostella*; protein; peptide mass fingerprinting; tandem mass spectrometry; bioinformatics

随着蛋白质组学逐渐成为后基因组时代的研究热点，蛋白质组学技术在昆虫学研究领域的应用也变得越来越广泛。昆虫蛋白质组学的研究目前主要集中于重要经济昆虫家蚕、模式生物果蝇、卫生害虫蚊虫和一些主要的农业害虫(刘凯于等，2006)。随着昆虫基因组研究的进展，特别是黑腹果蝇

基金项目：国家自然科学基金项目(30600403)；科技部农业科技成果转化资金项目(2008GB2C400138)
作者简介：谢苗，女，1977 年 11 月生，福建福州人，博士研究生，讲师，研究方向为昆虫生物化学与分子生物学，E-mail：xmshelly@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：msyou@fjau.edu.cn
收稿日期 Received：2009-04-21；接受日期 Accepted：2009-10-13

Drosophila melanogaster，冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，家蚕 *Bombyx mori*，意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 这 4 种昆虫的全基因组序列的完成（陈利珍等，2008），蛋白质组学技术在这些模式昆虫研究中也得到较广泛的应用（Alonso *et al*.，2005；Zhang *et al*.，2006；Lefevre *et al*.，2007）。同时，蛋白质组学技术在许多非模式昆虫中的应用也逐渐受到关注。近年来，随着质谱技术的不断发展，蛋白的鉴定效率和准确度得到了一定的提高。以固相 pH 梯度（immobilized pH gradient，IPG）、生物质谱和生物信息学为基础的双向电泳技术（2-DE）已经成为蛋白质组学研究的重要手段，特别是基质辅助激光解析离子飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）和肽指纹图谱（peptide mass fingerprinting，PMF）已经成为鉴定双向电泳中的大通量蛋白的优先方法。但是质谱鉴定技术存在的最大问题是，所鉴定的蛋白都要依赖已知的蛋白质和基因序列作为鉴定的基础，通过检索鉴定待测的蛋白质，这对全基因组测序未完成的物种来说，蛋白鉴定的效率受到了很大的影响。

对于非模式生物而言，选用一种合适的分析方法直接关系到蛋白质鉴定结果的准确性。利用蛋白质组学方法研究不同个体在不同生境和不同发育阶段蛋白质表达的差异，是蛋白质组学研究的一项重要内容。对昆虫不同生理龄期的生物化学方面的研究，可以让我们对其代谢系统有更深入的了解（Wolschin and Amdam，2007），不同时期蛋白表达的鉴定可能为新的防治策略提供重要的分子基础（Untalan *et al*.，2005）。本研究以小菜蛾 *Plutella xylostella* 敏感品系 2，3，4 龄幼虫的 2-DE 比较谱图中差异表达的第 1111 号点的蛋白质鉴定为例，初步探讨如何利用现有的技术，选择一个最适合于非模式昆虫蛋白质鉴定的方法，为更好地利用蛋白质组学技术提供参考。

1　材料和方法

1.1　实验材料

小菜蛾是室内经过长期培养的敏感品系，培养温度 25±1℃，光周期 L∶D=16∶8。小菜蛾成虫用 10% 蜂蜜饲养；幼虫在萝卜苗上取食生长。分别收集 2，3，4 龄的小菜蛾幼虫进行蛋白质提取。

1.2　蛋白质的提取、溶解及定量

三氯乙酸-丙酮沉淀法提取总蛋白质（Nguyen *et al*.，2007）。小菜蛾幼虫用液氮磨成粉末，悬浮于 10 倍体积的含 10% TCA、0.07% β-巯基乙醇的丙酮中，涡旋混合，－20℃沉淀过夜，20 000×g，4℃离心 30 min，弃上清，将沉淀再悬浮于 80% 丙酮中，－20℃沉淀 30 min，20 000×g，4℃离心 30 min，弃上清，沉淀再悬浮于丙酮中，－20℃沉淀 30 min，20 000×g，4℃离心 30 min，弃上清，最后将沉淀真空干燥，得到粗蛋白质粉末，－70℃密封保存备用。

将上述粗蛋白质粉末，以 1 mg∶20 μL 的比例加入蛋白质裂解液（7 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，4% CHAPS，65 mmol/L DTT，0.2% Bio-Lyte pH 3～10），充分浸泡，超声波助溶，每 5 min 涡旋一次。20 000×g，18℃离心 1 h，上清液即为蛋白质溶液，立刻进行双向电泳或者分装后－70℃保存。

参照夏其昌等（2004）方法略作改进后对蛋白质进行定量。

1.3　双向电泳

第一向等电聚焦：17 cm IPG 胶条（pH 5～8，线性），购自 BioRad 公司。每根胶条上样量为 2 mg，上样体积 350 μL，使用 BioRad 的 PROTEAN IEF 等电聚焦系统。设置以下程序进行主动水化和聚焦：50 V 12 h，250 V 0.5 h，1 000 V 1 h，4 000 V 1 h，10 000 V 5 h，10 000 V 聚焦至 60 000 Vh 结束电泳。胶条平衡后，进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶采用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.4　图像扫描与分析

扫描、采集图像，用 PDQuest 2D 分析软件对图像进行分析，包括定义蛋白质点的大小、强弱，检测和统计蛋白质点数目，计算蛋白质点的等电点和分子量等。

1.5　胶内酶切

蛋白质原位酶解按 Zheng 等（2008）的方法进行，将 2D 胶上的点取下后置于 500 μL Eppendorf 管中，经双蒸水反复冲洗后，加入含 25 mmol/L NH_4HCO_3 的 50% 乙腈溶液 100 μL，37℃保温 20 min脱色，移去其中的溶液，重复上步操作 2 次。然后加入 100 μL 的 100% 乙腈脱水 10 min，去乙腈，置 37℃烘箱中 5～10 min 至完全干胶。加入 12.5 ng/μL 的胰蛋白酶溶液 5～10 μL，4℃放置约 30 min，以确保胶粒能很好地吸收酶液，取出后在 37℃烘箱中酶解过夜。加入含有 0.1% TFA 的

50%乙腈 60 μL, 30 ~40 min 后，将溶液转移到新的酶标板内。重复 2 ~3 次。将肽段溶液在 N_2 流下吹干浓缩，以备用于质谱鉴定。

1.6 酶解肽段的质谱测序与检索

1.6.1 本地 EST 数据库的构建:从 NCBI 下载小菜蛾的 EST 序列(2008 年 12 月)，经过格式转换，按照正反各 3 种阅读框翻译每条 EST 序列，获得推导蛋白质序列作为其蛋白质数据库，本地 MASCOT 软件可以直接对其进行质谱匹配搜索。

1.6.2 直接测序:样品由 4700 MALDI-TOF/TOF Proteomics Analyzer(Applied Biosystem, USA)进行肽质量指纹图(PMF)和串联质谱(MS/MS)分析，所得质谱分析结果用 GPS(Applied Biosystems, USA)-MASCOT(Matrix Science, London, UK)进行数据库检索，采用 Combined(PMF + MS/ MS)模式检索 NCBInr 数据库，以鉴定蛋白质(卢雯静等，2007)。参数设置:激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器，加速电压为 20 kV，采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。PMF 质量扫描范围为 700 ~2 500 Da，且强度最大的 5 个峰进行串级质谱分析。搜索参数设置:检索种属为:Metazoa(Animals)；最大允许漏切位点为 1；酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置:PMF ± 200 ppm, MS/MS ±0.6 Da。

1.6.3 磺基异硫氰酸苯酯(SPITC)化学衍生后测序:2D 胶分离蛋白质点胰蛋白酶原位酶解产物用 C18 ZipTip 柱在其溶液中缓慢地吸上压下，重复数次以使其肽片段吸附在 ZipTip 头上；溶解磺基异硫氰酸苯酯(SPITC)于 0.2 mol/L N-甲基吗啉/醋酸缓冲液(pH 8.5)中，制备成浓度 0.01 g/mL 溶液，取 10 μL 于 0.2 mL EP 管中，将含有样品的 ZipTip 头在其中吸上压下数次，最后使溶液保持在柱上，在 55℃保湿 30 min，用 5% TFA 溶液过柱中止反应。用 0.1% TFA 冲洗 ZipTip 柱数次除去盐及杂质，将样品洗脱在 2 μL 新鲜制备的饱和 HCCA 溶液(5 g/L)中，混合均匀后取 1 μL 点板，空气中自然干燥后进行质谱测定。根据 MALDI-TOF/TOF 提供的氨基酸残基离子(immonium)的质荷比(m/z)值，对修饰后经过质谱分析得到的 MS/MS 图进行手工测序，将得到的序列在 NCBI 中进行 BLAST(Leon *et al*., 2007)。

2 结果与分析

2.1 不同龄期的小菜蛾幼虫蛋白质 2-DE 胶图谱比较

分别提取小菜蛾 2，3，4 龄期幼虫的总蛋白，并进行 2-D 电泳分离蛋白质，得到电泳图谱(图 1)。经过电泳图谱的分析，有 24 个差异性表达蛋白质点。第 1111 号蛋白质点(图 1 中箭头所示)在 2 龄幼虫中的表达量较 3、4 龄幼虫低，而且该点清晰，差异明显，可进一步分析。

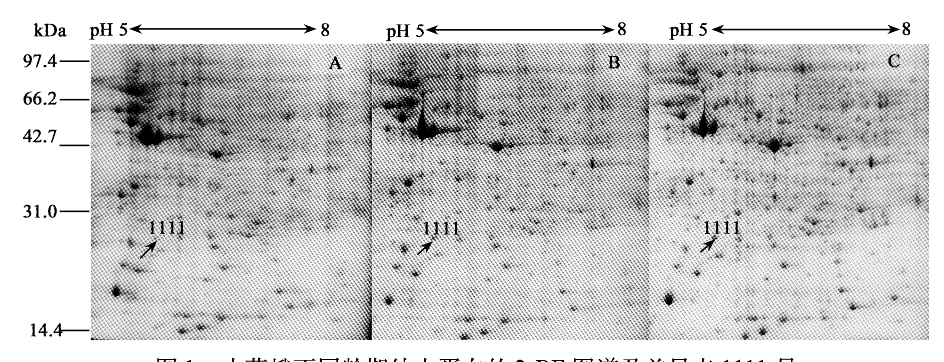


图 1 小菜蛾不同龄期幼虫蛋白的 2-DE 图谱及差异点 1111 号

Fig. 1 2-DE map of the protein extracted from different instars of *Plutella xylostella* larvae and the spot 1111

A: 2 龄幼虫 2nd instar larva; B: 3 龄幼虫 3rd instar larva; C: 4 龄幼虫 4th instar larva.

2.2 蛋白质胶内酶切后的质谱分析

从 2D 胶挖下 1111 号蛋白质点，胰蛋白酶胶酶切产物用 MALDI-TOF/TOF 质谱仪进行质谱分析，获得酶解多肽的 PMF(图 2:A)，然后选择强度大、峰形好的 5 个肽离子，进行二级质谱分析，得到二级质谱图；图 2(B)为其中 1 531.8 Da 的肽离子的 MS/MS 谱图]，图中横轴是离子的质量与电荷的比值，即质荷比(m/z)；纵轴是对应离子的相对强度，表示检测到的离子信号的相对强弱。质谱图峰形明显，解析度高，可以用于数据的分析和蛋白质数据库的搜索。

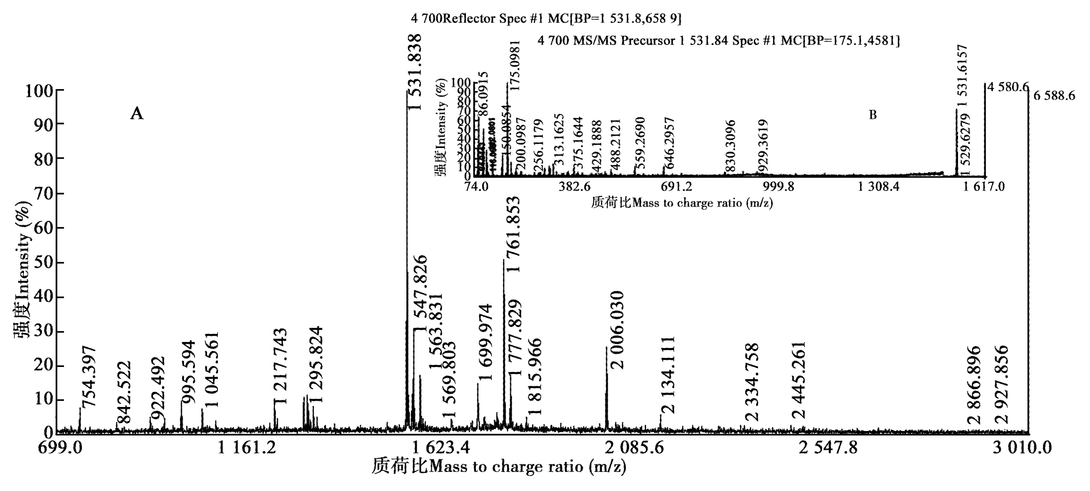


图 2　蛋白质胶内酶切后的质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry of protein in-gel digestion

A：第 1111 号蛋白质点酶切后的肽质量指纹图（PMF）MAlDI-TOF spectrum of the tryptic digestion of the spot 1111；B：分子量为 1 531.8 Da 的肽离子的 MS/MS 谱图 MS/MS spectrum of 1 531.8 Da peptide ion acquired with the MALDI-TOF/TOF.

2.2.1　用 PMF 搜索蛋白质的数据库：用 Data Explorer 软件从 MS 质谱中提取峰值，在设置好信噪比（S/N）、基线校准之后，获得质谱峰值用于数据库搜索。将 1111 号蛋白质点的 PMF 分别用 ProFound 和 MASCOT 搜索数据库。ProFound 搜索结果中的首项为家鼷鼠 *Mus musculus* 线粒体的核糖体蛋白，随机匹配的概率大于 5%，因此使用 ProFound 搜索没有成功。MASCOT 搜索结果中的首项为文昌鱼 *Branchiostoma floridae* 的一个假定蛋白，虽然该搜索结果已经大于 5% 的临界值，即随机匹配的可能性小于 5%，但该蛋白分子量为 167 287 Da，与 2-DE 谱图上的 1111 点的分子量差距很大，同时物种距离较远，而且为假定蛋白，因此该点蛋白还需要进一步分析。

2.2.2　用 PMF + MS/MS 搜索蛋白质的数据库：根据一级质谱测得的肽指纹信息和串联质谱信息提交蛋白质数据库进行鉴定，第 1111 号点蛋白的质谱数据通过 GPS 软件用 Combined（PMF + MS/ MS）模式检索 NCBInr 数据库。MASCOT 搜索的结果中，首项搜索结果为拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura* 的假定蛋白 GA18218-PA，最高分值为 73，略大于 5% 显著水平的临界值，说明该蛋白质是随机匹配的可能性小于 5%。虽然同样是昆虫，有 13 个肽段匹配，氨基酸序列覆盖率达到 24%，但由于所得分值刚刚超过临界值，而且该蛋白为未知功能的由基因组推导出的假定蛋白质，分子量 66 280 Da，估算的 pI 值为 7.36，与实际 2-DE 图上的位置有较大差距，仍然不能判定是否准确，所以考虑使用更准确的质谱测序分析手段。

2.2.3　EST 数据库的检索：质谱数据搜索 EST 数据库成功鉴定蛋白质，大大提高了基因组序列未知生物蛋白质鉴定的成功率。小菜蛾 EST 可以作为研究小菜蛾蛋白质组学的重要资源。1111 号蛋白质点的质谱用 MASCOT 搜索本地 EST 库，在小菜蛾 EST 库中匹配的 EST 序列（gi|53884350）分值为 118，远大于 5% 显著水平的临界值 54，达到了显著水平。

经过 blastx 比对，该 EST 反向第二框架翻译的蛋白质序列与家蚕的氢离子转运 ATP 合酶 d 亚基（H^+ transporting ATP synthase subunit d，gi|153791739）高度相似。通过小菜蛾 EST 库搜索出的家蚕的氢离子转运 ATP 合酶 d 亚基和 MASCOTt 直接搜索 NCBInr 的第一匹配项（gi|54644087，图 3）不同，但匹配蛋白的分子量为 16 009 Da，pI 值为 5.16，与 2D 电泳图谱中的 1111 点的分子量和 pI 值都相近，同时家蚕与小菜蛾同属鳞翅目，亲缘关系更近，因此从 EST 库搜索的结果可信度较高，较 MASCOT 直接搜索 NCBInr 库的结果更为准确。为了鉴定该结果的准确度，我们进一步使用了质谱测序分析手段。

2.3　经过 SPITC 衍生的 *de novo* 测序结果

肽片段的部分测序是用化学模式从 N-末端降解，形成大小不同的肽片段，得到一定数目的肽质量由 MALDI-TOF/TOF 测定。通常在肽链经过诱导碰撞碎裂（collision-induced dissociation，CID）的断裂过程中，肽键有 3 种断裂方式，可以产生 6 种类

型的碎片离子，即 N 端的 *a*，*b*，*c* 型离子与 *C* 端的 *x*，*y*，*z* 型离子，每种断裂类型分别生成互补的两种离子，如 *a-x*，*b-y*，*c-z*，另外，还可能产生其他更复杂的断裂产生的离子，因此谱图比较复杂，进行 *de novo* 测序时解析困难。磺基异硫氰酸苯酯（4-sulfophenyl isothiocyanate，SPITC）是一种肽片段的 N 端磺酸化试剂，经过 SPITC 修饰后的 *de novo* 测序，是在传统的 MS/MS 测序方法基础上发展起来的一种优化的测序方法。从同样质量的肽离子比较未经过 SPITC 修饰的和经过 SPITC 修饰后的两张图谱（图 3 和 4）可以发现，采用 SPITC 修饰方法得到的图谱只包含简单的 *y* 离子系列，背景干净，信噪比高，可得到准确可信的序列，图 4 和 5 中 *y* 离子右侧的数字表示该离子所含有的氨基酸残基数目。对 1111 号点的胶上蛋白质进行 SPITC 衍生后 *de novo* 测序，根据 MALDI-TOF/TOF 提供的氨基酸残基离子的 m/z 值，对修饰后经过质谱分析得到的二级质谱图进行手工测序，其中质量为 1 530.9 的肽离子测序图谱及手工解得的序列如图 4 所示，质量为 1 729.8 的肽离子图谱和序列如图 5 所示。

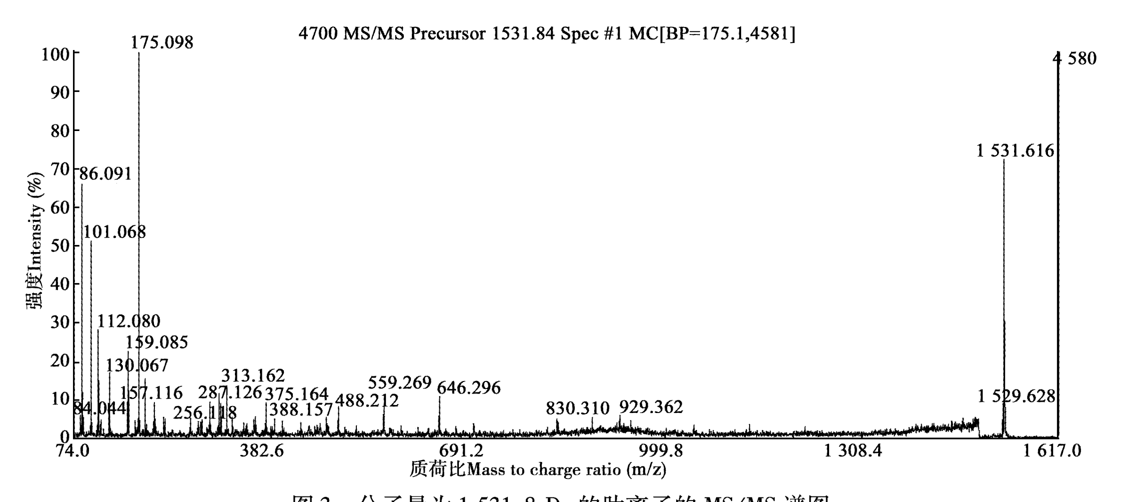


图 3　分子量为 1 531.8 Da 的肽离子的 MS/MS 谱图

Fig. 3　MS/MS spectrum of 1 531.8 Da peptide ion acquired with the MALDI-TOF/TOF（ MH^+ at m/z 1531.8）

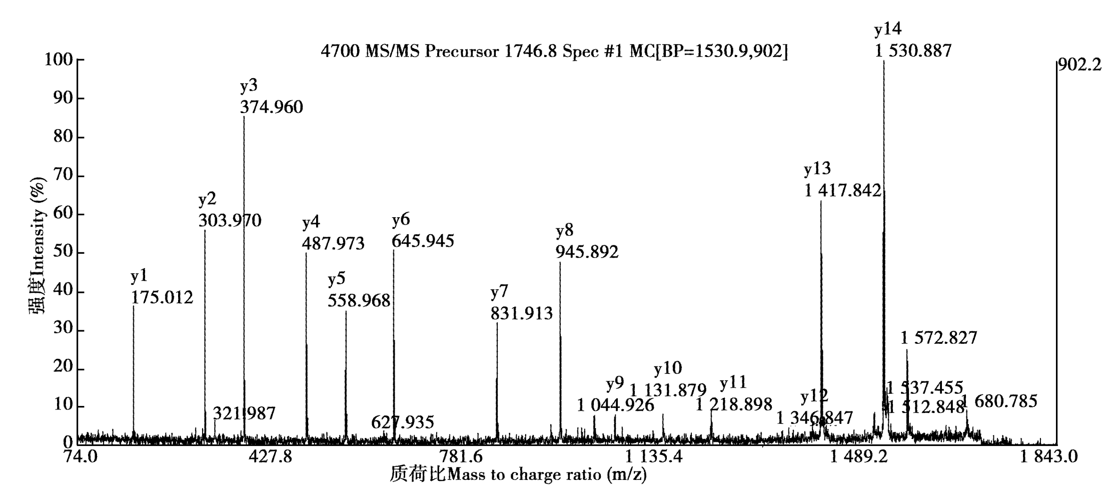


图 4　第 1111 蛋白质点经 SPITC 衍生修饰后的质量为 1 530.9 的肽离子 MALDI-TOF/TOF 谱图

Fig. 4 MS/MS spectrum of 1 530.9 Da peptide ion obtained with MALDI-TOF/TOF from the spot 1111 derived with SPITC（ MH^+ at m/z 1 530.9）

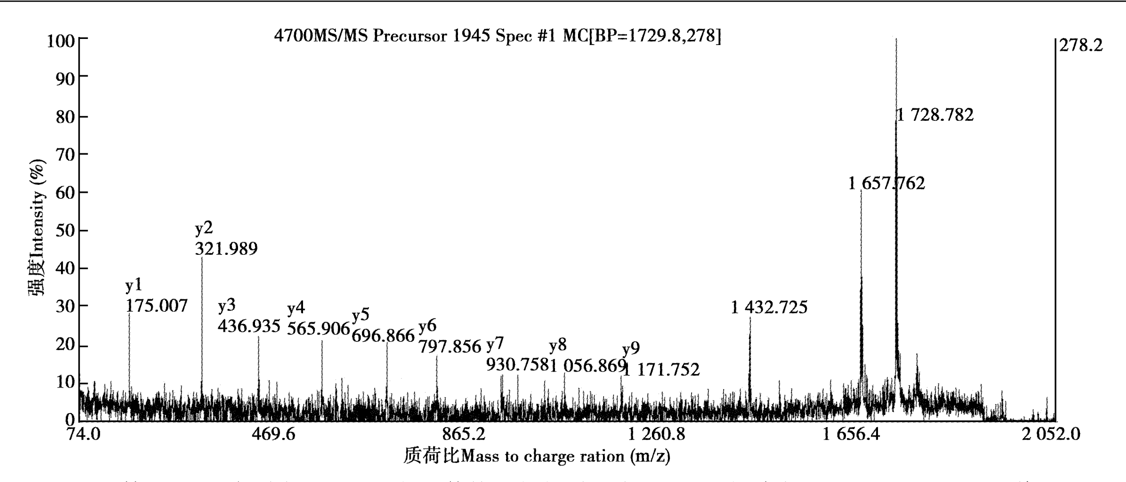


图 5 第 1111 蛋白质点经 SPITC 衍生修饰后的的质量为 1 729.8 的肽离子 MALDI-TOF/TOF 谱图

Fig. 5 MS/MS spectrum of 1 729.8 Da peptide ion acquired with the MALDI-TOF/TOF(MH^+ at m/z 1729.8)

从图 4 的谱图中，可以解出，质量为 1 531 的肽段序列是(I/L)A(Q/K)SSVNWSA(I/L)AER，从图 5 中解得质量为 1 729 的肽段序列为 D(Q/K)MTMEDFR，将所得到的肽段在 NCBI 中进行 Blast，得出该蛋白的最高匹配结果是致倦库蚊 ATP 合酶 D 链(gi|170051211)。经过 SPITC 修饰后所得的序列是可信的，以此序列搜索出的匹配结果可以说是准确的。这个匹配结果与 2.2.3 中的搜索结果近似，都为昆虫的 ATP 合酶的亚基链，因此可以确定该蛋白质与 ATP 合酶的 d 亚基具有高度同源性。ATP 合酶是生物体能量代谢的关键酶，参与氧化磷酸化反应，在跨膜质子动力势的推动下，催化 ATP 的水解和质子的跨膜输运；还可能作为一种保幼激素结合蛋白(juvenile hormone binding protein，JHBP)的膜结合蛋白，参与到 JHBP 的输出中(Zalewska *et al.*，2009)。本研究发现在小菜蛾的不同生长时期，ATP 合酶的表达量也发生变化，相关的功能有待后续研究。

3　讨论

利用 MALDI-TOF MS 得到的 PMF 与数据库中的蛋白质的理论 PMF 比对，已经普遍被用于 2-DE 中得到的感兴趣蛋白点的鉴定(Graves and Haystead，2002)，具有速度快，通量高的优点，但肽段分子量精确度往往不够理想，且蛋白质数据库的不完善，搜索软件或搜索条件的改变都可能影响鉴定结果(刘康等，2008)。对于未得到全基因组的或没有蛋白质数据库的昆虫而言，在开放数据库中只能得到有限的序列信息(Wang *et al.*，2007)。因此，在本研究中使用 MALDI-TOF MS 直接搜索数据库未能成功鉴定第 1111 号点的蛋白质。采用 Combined(PMF + MS/MS)模式进行检索，在一定程度上增加了蛋白质鉴定的准确性(He *et al.*，2008)。我们的实验结果表明，这种根据酶切片段的分子量信息来搜索蛋白质数据库，当匹配的是不同物种的蛋白质时，容易产生偏差，对于非模式昆虫而言，匹配率仍很有限。在这种情况下，对相同或近缘物种的 EST 库进行检索，由于蛋白质同源性高，得到的匹配蛋白的信息会更加可信。

采用 N-端磺基化修饰剂 SPITC 修饰后进行 *de novo* 测序应是准确判定蛋白的较好选择。磺基化试剂选择性地与肽段的 N 端氨基酸反应，衍生后的肽段在质谱检测时会产生单一的 *y* 系列离子，可简化谱图的复杂性(Wang *et al.*，2004)，用此方法进行的鉴定，成功率高，可信度大，能够提高对未知蛋白鉴定的准确性及其通量水平。SPITC 是一种有效且稳定的磺基化试剂，我们的实验结果表明利用 MALDI-TOF/TOF 质谱结合磺基修饰剂 SPITC 辅助的 *de novo* 测序方法适合于未知蛋白的鉴定。但采用这种方法，存在费用高、所需样品量大等不足之处。

对于非模式昆虫的蛋白质组学研究而言，利用 PMF + MS/MS 的混合检索方式，同时检索多种数据库可以提高蛋白质鉴定的成功率。有些单位或实验室尚未建立某物种的 EST 数据库，在进行蛋白质鉴定时可以充分利用 NCBI 等开放数据库资源下载相同物种或近缘种的 EST 数据库，将其转化成本地数据库进行查询，扩大搜索范围，提高鉴定的成功率。例如，在本研究中，可以下载鳞翅目中已发表

的多个物种的 EST 序列，分别建立不同物种的数据库。通过多个数据库的共享和互补，可以充分提高蛋白质的鉴定成功率和通量水平。在该方法无法鉴定出可靠结果的情况下，再进一步采用 SPITC 等修饰剂进行修饰后测序、鉴定。

蛋白质组学的发展，单凭一种分析技术经常无法准确鉴定蛋白，通过使用不同的分析手段，可以起到互为补充的作用，有利于提高蛋白质鉴定的效率和准确度。

致谢 本文的工作得到了农业部“亚热带农业生物灾害与治理”重点开放实验室和福建省高等学校“农业生物多样性与生态安全”重点实验室的支持！

参 考 文 献 (References)

Alonso J, Rodriguez JM, Baena-Lopez LA, Santaren JF, 2005. Characterization of the *Drosophila melanogaster* mitochondrial proteome. *J. Proteome Res.*, 4(5): 1 636 – 1 645.

Chen LZ, Liang GM, Wu KM, Guo YY, 2008. Progress of proteomics and its application in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 51(8): 868 – 875. [陈利珍, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元, 2008. 蛋白质组学技术的发展及其在昆虫中的应用. 昆虫学报 51(8): 868 – 875]

Graves PR, Haystead TA, 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 39 – 63.

He Z, Yang C, Yu W, 2008. Peak bagging for peptide mass fingerprinting. *Bioinformatics*, 24(10): 1 293 – 1 299.

Lefevre T, Thomas F, Schwartz A, Levashina E, Blandin S, Brizard JP, Le Bourligu L, Demettre E, Renaud F, Biron DG, 2007. Malaria *Plasmodium* agent induces alteration in the head proteome of their *Anopheles* mosquito host. *Proteomics*, 7(11): 1 908 – 1 915.

Leon IR, Neves-Ferreira AG, Valente RH, Mota EM, Lenzi HL, Perales J, 2007. Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with unknown genome. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1 363 – 1 374.

Liu K, Gao QF, Wan ZK, Mao CJ, Zhang TZ, 2008. Mass spectrum identification and bioinformatics analysis in proteomic research. *Cotton Science*, 20: 281 – 288. [刘康, 高起飞, 万振昆, 毛婵娟, 张天真, 2008. 蛋白质组学研究中的质谱鉴定与生物信息学分析. 棉花学报, 20: 281 – 288.]

Liu KY, Qiu BG, Hong HZ, Peng JX, 2007. Insect differential proteome: Progress and prospects. *Acta Entomologica Sinica*, 49(4): 680 – 686. [刘凯于, 邱宝国, 洪华珠, 彭建新, 2006. 昆虫差异蛋白质组:进展和展望. 昆虫学报, 49: 680 – 686]

Lu WJ, Liu YK, Sun QL, Zhou HJ, Zhou XW, Guo K, Lu HJ, Yang PY, 2007. Wheatgermagglutinin affinity glycoprotein expression profile of normal human liver tissue. *Fudan University Journal of Medical Sciences*, 34: 29 – 36. [卢雯静, 刘银坤, 孙强玲, 周海军, 周新文, 郭坤, 陆豪杰, 杨芃原, 2007. 健康人肝组织麦胚凝集素亲和型糖蛋白表达谱分析. 复旦学报 (医学版), 34: 29 – 36]

Nguyen TTA, Michaud D, Cloutier C, 2007. Proteomic profiling of aphid *Macrosiphum euphorbiae* responses to host-plant-mediated stress induced by defoliation and water deficit. *J. Insect Physiol.*, 53: 601 – 611.

Untalan PM, Guerrero FD, Haines LR, Pearson TW, 2005. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(2): 141 – 151.

Wang C, Cao Y, Wang Z, Yin Y, Peng G, Li Z, Zhao H, Xia Y, 2007. Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96: 230 – 236.

Wang D, Kalb SR, Cotter RJ, 2004. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(1): 96 – 102.

Wolschin F, Amdam GV, 2007. Comparative proteomics reveal characteristics of life-history transitions in a social insect. *Proteome Science*, 5(1): 10.

Xia QC, Zeng R *et al.*, 2004. Protein Chemistry and Proteomics. Science Press, Beijing. 277 – 278. [夏其昌, 曾嵘等, 2004. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社. 277 – 278]

Zalewska M, Kochman A, Estève JP, Lopez F, Chaoui K, Susini C, Ożyhar A, Kochman M, 2009. Juvenile hormone binding protein traffic – Interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins. *BBA-Biomembranes*, 1 788(9): 1 695 – 1 705.

Zhang P, Aso Y, Yamamoto K, Banno Y, Wang Y, Tsuchida K, Kawaguchi Y, Fujii H, 2006. Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics*, 6(8): 2 586 – 2 599.

Zheng X, Hong L, Shi L, Guo J, Sun Z, Zhou J, 2008. Proteomics analysis of host cells infected with infectious bursal disease virus. *Mol. Cell. Proteomics*, 7(3): 612 – 625.

(责任编辑:邓艳)